

EVALUACIÓN DE TÉCNICAS RÁPIDAS DE ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS EN HEMOCULTIVOS POSITIVOS

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Autora: Mainer del Cid Gómez

Director: Iván Manuel Vicente

Codirectoras: Izaskun Alejo Cancho

Ana Gual de Torrella Bennasar

GRADO EN FARMACIA
CURSO ACADÉMICO 2021-2022
FEBRERO DE 2022

ÍNDICE

ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVOS	8
DESARROLLO	9
MATERIAL Y MÉTODOS	9
Muestras	9
Métodos de rutina	9
Métodos a estudio	11
Análisis de datos	13
RESULTADOS	14
Antibiograma por difusión en disco	14
<i>E. coli</i>	14
<i>K. pneumoniae</i>	14
<i>P. aeruginosa</i>	14
<i>S. aureus</i>	14
<i>S. pneumoniae</i>	15
Antibiograma por microdilución	15
<i>E. coli</i>	15
<i>K. pneumoniae</i>	15
<i>S. aureus</i>	16
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFÍA	23
ANEXO I	

ABREVIATURAS

ATB: Antibiótico

ATU: *Area of technical uncertainty* (área de incertidumbre técnica)

CMI: Concentración mínima inhibitoria

EUCAST: *European committee on antimicrobial susceptibility testing* (comité europeo de pruebas de sensibilidad a antimicrobianos)

MALDI-TOF: *Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight* (desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo)

ME: *Major error* (errores mayores)

mE: *Minor error* (errores menores)

SPS: Polianetol sulfonato de sodio

TC: Total categorizados

TL: Total leídos

VME: *Very major error* (errores muy graves)

RESUMEN

Los procesos de sepsis están asociados a una elevada morbimortalidad y requieren de la rápida administración de un tratamiento antibiótico empírico en función de los datos clínicos del paciente y de la epidemiología local de la resistencia antibiótica.

El hemocultivo es el principal método de diagnóstico para determinar la etiología de la bacteriemia. Mediante las técnicas de rutina, los resultados de identificación y antibiograma puede tardar más de 24 horas. El objetivo de este estudio es evaluar dos técnicas rápidas de antibiograma (una por difusión en disco y otra por microdilución) a partir del frasco de hemocultivo para tratar de adelantar el resultado.

Los resultados de antibiograma por difusión en disco de los hemocultivos positivos para *E. coli* mostraron buena concordancia con los métodos de rutina para la mayoría de los antibióticos, excepto piperacilina-tazobactam y ceftazidima. En general, la cantidad de resultados no categorizables (ATU) fue disminuyendo a medida que aumentaban las horas de incubación. En el caso del antibiograma por microdilución, los resultados mostraron buena concordancia con los métodos de rutina, excepto en el caso de cotrimoxazol.

Los métodos estudiados, en el caso de *E. coli*, mostraron una mayor concordancia con los resultados de rutina a las 8 horas en el caso de los antibiogramas por difusión en disco y en 24 horas en la microdilución. Sin embargo, la muestra estudiada es pequeña, por lo que habría que ampliar el estudio antes de establecer un nuevo protocolo que permita acortar los tiempos.

INTRODUCCIÓN

La sepsis es un fallo multiorgánico debido a una infección sistémica que puede estar causada por bacterias (bacteriemia) u hongos (fungemia). En este último caso, el tipo más frecuente es el causado por levaduras del género *Candida* (candidemia). La sepsis afecta a 100-150 de cada 100.000 habitantes/año y causa la muerte hasta en un tercio de los casos, siendo esta la principal causa de muerte infecciosa¹.

Diferentes estudios han probado que un retraso en el inicio del tratamiento antibiótico tiene un gran impacto en la morbimortalidad. Cada hora de retraso en el inicio del tratamiento antimicrobiano adecuado se asocia a una disminución del 7,6% de la supervivencia¹. Hoy en día, las directrices internacionales sugieren que el tratamiento debe iniciarse lo antes posible en los casos de sepsis grave y shock séptico². Notificar de forma temprana los resultados de sensibilidad a antibióticos permite modificar el tratamiento empírico en caso de ser necesario, pudiendo así reducir la aparición de resistencias a antibióticos, la mortalidad de los pacientes y los costes hospitalarios³.

Desde su descubrimiento hace más de un siglo, la utilización de antibióticos ha sido un éxito, no solo por el tratamiento de enfermedades que hasta ese momento podían ser mortales permitiendo así alargar la esperanza de vida, sino porque su uso ha hecho posible el éxito de trasplantes de órganos y cirugías invasivas de alto nivel⁴. Sin embargo, en las últimas décadas se han detectado bacterias resistentes a múltiples fármacos, conocidas como bacterias multirresistentes o superbacterias. La prevalencia de resistencias bacterianas a múltiples fármacos es una amenaza de primer nivel para la salud pública a escala mundial⁵. El hecho de que existan este tipo de bacterias que no son sensibles a los antibióticos más utilizados, genera un aumento de la morbimortalidad y hace que la elección de un tratamiento antimicrobiano basado en la identificación del agente causal pueda no ser el adecuado. Esto hace necesario el desarrollo de metodologías que permitan a los laboratorios de Microbiología y Parasitología Clínica emitir resultados de sensibilidad a antimicrobianos en un tiempo lo más breve posible.

La aparición de resistencias a los antibióticos es debida, principalmente, al uso excesivo de éstos a nivel ambulatorio (80%)⁵. El uso de antibióticos en una determinada población puede aumentar el nivel de resistencias de otra por medio de la transmisión de bacterias resistentes a los antibióticos entre ambas⁵. La interacción entre poblaciones hace que el riesgo de que una persona sufra una infección por un patógeno resistente a los antibióticos dependa tanto del uso que el propio paciente hace de los antibióticos como del que hacen sus contactos.

A lo largo de la historia, los organismos procariotas han desarrollado resistencias de forma natural para defenderse y sobrevivir. El uso continuado de los antibióticos y, por lo tanto, la exposición a éstos hace que las resistencias se desarrollen con frecuencia⁶. Uno de los principales mecanismos de resistencia de las bacterias es la producción de enzimas que pueden inactivar los antibióticos utilizados para paliar las infecciones originadas por ellas⁵.

Ya en la década de 1940 la penicilina era el principal antibiótico utilizado para tratar las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*⁷. Sin embargo, el uso frecuente de este antibiótico hizo que la bacteria presentase resistencia a penicilina por acción de una enzima conocida como penicilinasa (β -lactamasa); y así, actualmente menos del 10% de los *S. aureus* aislados de pacientes son sensibles a la penicilina (**Imagen 1**).

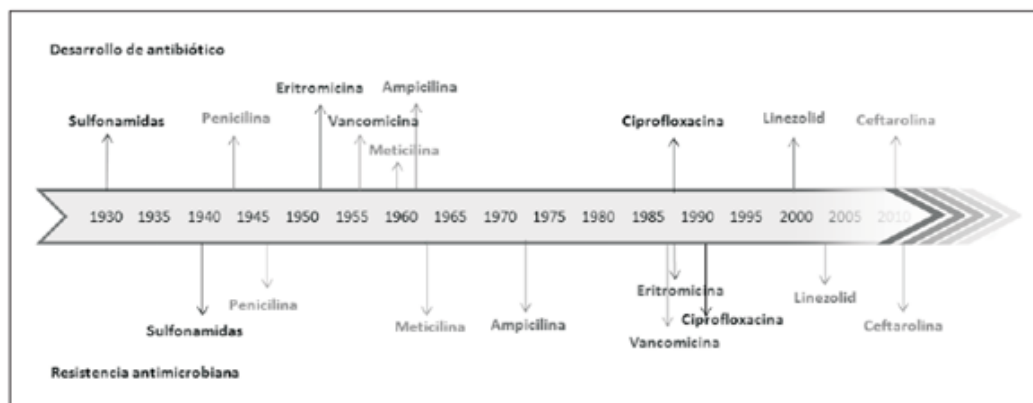


Imagen 1. Desarrollo y resistencia antimicrobiana a lo largo del tiempo. Imagen obtenida del artículo de Camou T. et al⁸.

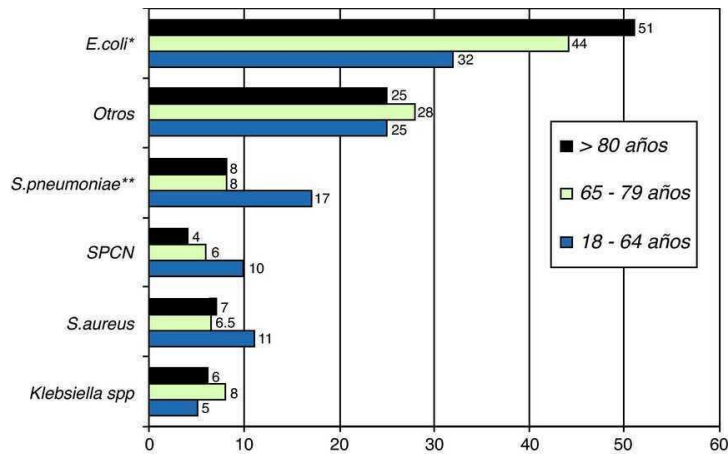
El laboratorio de Microbiología y Parasitología Clínica juega un papel crucial en el diagnóstico y control de las enfermedades infecciosas, siendo el hemocultivo la principal herramienta utilizada para el diagnóstico de las bacteriemias^{1,9}. El hemocultivo consiste en el cultivo de sangre del paciente, obtenida por venopunción. Los frascos en los que se realiza contienen medios de cultivo enriquecidos con diferentes nutrientes que permiten el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias facultativas, y también de microorganismos anaerobios facultativos y estrictos. También llevan otros componentes como anticoagulante SPS (polianetol sulfonato de sodio) que neutraliza la actividad bactericida del suero, y carbón o resinas para neutralizar el efecto de antibióticos de los pacientes que se encuentran en tratamiento¹.

Según el protocolo, ante un paciente con síntomas sugestivos de sepsis (escalofríos y fiebre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), hipotermia en neonatos, y/o signos de infección local), está indicada la extracción de dos pares de hemocultivos (para cultivo en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis) de forma aséptica¹. La asepsia en la extracción de sangre es de vital importancia para evitar la contaminación de estos con la microbiota de la piel, y así evitar un diagnóstico erróneo. Aun así, en ocasiones, los hemocultivos se contaminan con microorganismos presentes en el entorno y/o que pueden encontrarse en la piel, como es el caso de los estafilococos coagulasa-negativos¹.

De forma rutinaria, tras la llegada al laboratorio de frascos de hemocultivos, éstos se incuban en equipos automatizados donde permanecen habitualmente 5 días en incubación. Sin embargo, el 85-90% de los hemocultivos de pacientes con bacteriemia acaban siendo positivos en menos de 48 horas¹. Tras la detección de crecimiento en alguno de los frascos de hemocultivo se procede a la tinción de Gram y al subcultivo en agar sangre y/o agar chocolate u otros, los cuales se incuban unas 18-24h.

La tinción de Gram permite diferenciar las bacterias en dos grandes grupos: bacterias grampositivas y gramnegativas, a excepción de micobacterias y micoplasmas. La tinción de Gram es una herramienta clave para identificar rápidamente qué tipo de microorganismo/s se encuentran en el hemocultivo permitiendo establecer un tratamiento empírico más dirigido antes de contar con la identificación definitiva del microorganismo y con los datos de sensibilidad a antimicrobianos, permitiendo, si fuese necesario, un cambio en el tratamiento antimicrobiano empírico. La principal diferencia entre las bacterias grampositivas y gramnegativas es que las primeras presentan una capa gruesa de peptidoglicano y las segundas, por el contrario, presentan una delgada capa de peptidoglicano y una membrana externa que las rodea⁷. Esta diferencia estructural hace que no todos los antibióticos puedan ser útiles frente a ambos tipos de bacterias; por ejemplo, la vancomicina se utiliza para tratar las infecciones originadas por bacterias grampositivas, pero no puede atravesar la membrana externa de las gramnegativas⁷.

Los bacilos gramnegativos que se aíslan más frecuentemente en los hemocultivos son las enterobacterias como *Escherichia coli* (**Imagen 2**). En cambio, los grampositivos aislados con mayor frecuencia pertenecen a los géneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp.¹.



Los números expresan porcentajes.

* - $P < 0,001$ para los > 80 años versus el de 18-64 años y $p = 0,039$ versus el de 65-79 años de edad.

** - $P < 0,001$ para los > 80 años versus el de 18-64 años y $p > 0,05$ versus el de 65-79 años de edad.

Rev Clin Esp. 2012;212:273-80

Imagen 2. Distribución de microorganismos aislados según el grupo de edad. Imagen obtenida de Muñoz-Gamito G. et al¹⁰.

Clásicamente, a partir del subcultivo se realizaba la identificación del microorganismo y el antibiograma. Hablamos de antibiograma cuando nos referimos a aquellas pruebas que nos permiten determinar la sensibilidad que presenta una bacteria frente a un conjunto de agentes antimicrobianos¹¹. El antibiograma en los laboratorios de Microbiología y Parasitología Clínica suele realizarse por varios métodos, destacando la difusión en disco y la microdilución en caldo. El primer método consiste en inocular el microorganismo en un medio de cultivo sólido y, posteriormente, colocar los discos de papel que contienen impregnado el antibiótico, el cual difunde en el agar generando un gradiente de concentración¹². Así, tras la incubación de la placa, se forma un halo de inhibición alrededor del disco de mayor o menor diámetro en función de la concentración necesaria de antimicrobiano para inhibir el crecimiento del microorganismo. El segundo método consiste en inocular la cepa bacteriana en un medio líquido con una cantidad conocida de antibiótico¹². Este método nos aporta un resultado cuantitativo, ya que indica la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento del microorganismo (CMI). Otro método por el cual puede determinarse la CMI son las tiras de difusión en gradiente como ETEST® (bioMérieux) (Imagen 3).

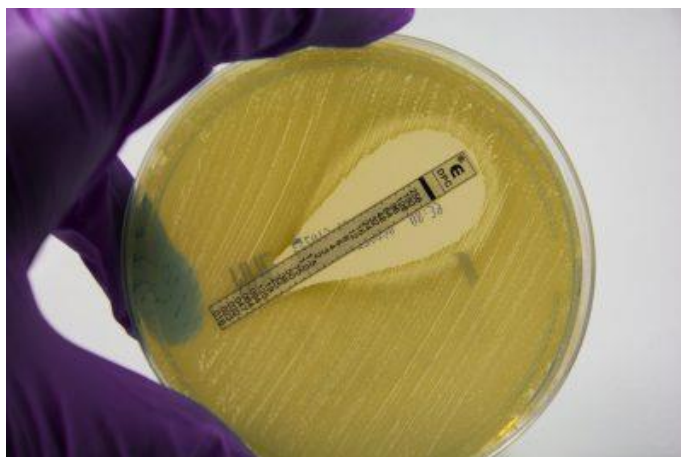


Imagen 3. Inhibición del crecimiento bacteriano en gradiente de concentración frente a una cepa clínica. Imagen obtenida de <https://www.semicrobiologia.org/imagen-banco/e-test>.

Actualmente, el laboratorio de Microbiología y Parasitología Clínica cuenta con técnicas rápidas de identificación (p.ej. MALDI-TOF) que permiten obtener resultados en menos de una hora y también se llevan a cabo técnicas de antibiograma directamente a partir de los frascos de hemocultivos positivos. Sin embargo, y a pesar de estos avances, los resultados del antibiograma no están disponibles hasta 24 horas después de la detección de un hemocultivo positivo, por lo que se retrasa también la elección del tratamiento adecuado para el paciente.

Teniendo en cuenta la emergencia sanitaria derivada del aumento de las resistencias en la que nos encontramos ante un caso de sepsis y lo imprescindible que es agilizar el tiempo para poder ajustar el tratamiento antimicrobiano al patógeno causante¹³, resulta indispensable la optimización de protocolos dentro del laboratorio de Microbiología y Parasitología Clínica, buscando nuevos procedimientos que permitan obtener resultados fiables en el menor tiempo posible.

OBJETIVOS

El objetivo del trabajo consiste en evaluar dos técnicas rápidas de estudio de sensibilidad a antimicrobianos (antibiogramas) en hemocultivos positivos para tratar de acortar el tiempo hasta la obtención de resultados. El estudio consistirá en la evaluación de los resultados obtenidos en dos técnicas de antibiograma (una por difusión en disco y otra por microdilución) realizadas directamente del frasco de hemocultivo positivo sin esperar al crecimiento del

subcultivo. Las lecturas de los antibiogramas se realizarán tras diferentes tiempos de incubación. Las tareas para realizar serán las siguientes:

- Realización de antibiograma directo por difusión en disco y microdilución de hemocultivos positivos.
- Lecturas de los antibiogramas por difusión en disco a las 4, 6 y 8 horas y microdilución a las 4, 6, 8 y 24 horas.
- Comparación de los resultados obtenidos con los resultados de rutina emitidos por el facultativo responsable del Hospital de Galdakao-Usansolo empleando medios validados.

DESARROLLO

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Para el presente estudio se emplearon hemocultivos positivos trabajados en el Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica del Hospital de Galdakao-Usansolo (Vizcaya, España), que se incubaron en el instrumento BD BACTEC™ FX, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. BD BACTEC™ FX (BD) es un sistema automatizado utilizado para incubar y detectar crecimiento de microorganismos en muestras clínicas inoculadas en frascos de hemocultivo. La detección de un frasco positivo se determina mediante un fotodetector que mide los niveles de fluorescencia emitidos por cada vial y que, a su vez, se corresponden con los niveles de CO₂ emitidos por los microorganismos en crecimiento¹.

En el estudio se incluyeron de forma prospectiva todos los hemocultivos positivos detectados entre septiembre y noviembre de 2021 en los que se identificó *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, y *Streptococcus pneumoniae*; y fueron excluidos los que presentaban bacteriemia mixta (presencia de más de una bacteria en el frasco) y los causados por otros microorganismos.

Métodos de rutina

A los frascos de hemocultivo positivos se les realizó una tinción de Gram seguido de identificación directa mediante un sistema de espectrometría de masas (*Matrix assisted laser*

desorption/ionization-time of flight (desorción/ionización laser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF)) y un antibiograma directo por difusión en disco en los casos indicados. Además, se realizó un subcultivo en placas de agar sangre y agar chocolate que se introdujeron en la estufa de cultivo a 36°C (+/- 1°C) durante 24 horas.

A partir del subcultivo se realizó el antibiograma por microdilución en el sistema MicroScan® (Siemens), cuya lectura se realizará a las 24 horas. La interpretación de resultados de los antibiogramas se realizó siguiendo las normas de EUCAST de 2021 (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf). Esto engloba un total de tiempo desde que se detecta el frasco de hemocultivo positivo hasta que se da el resultado definitivo de unas 48 horas aproximadamente. (Imagen 4).

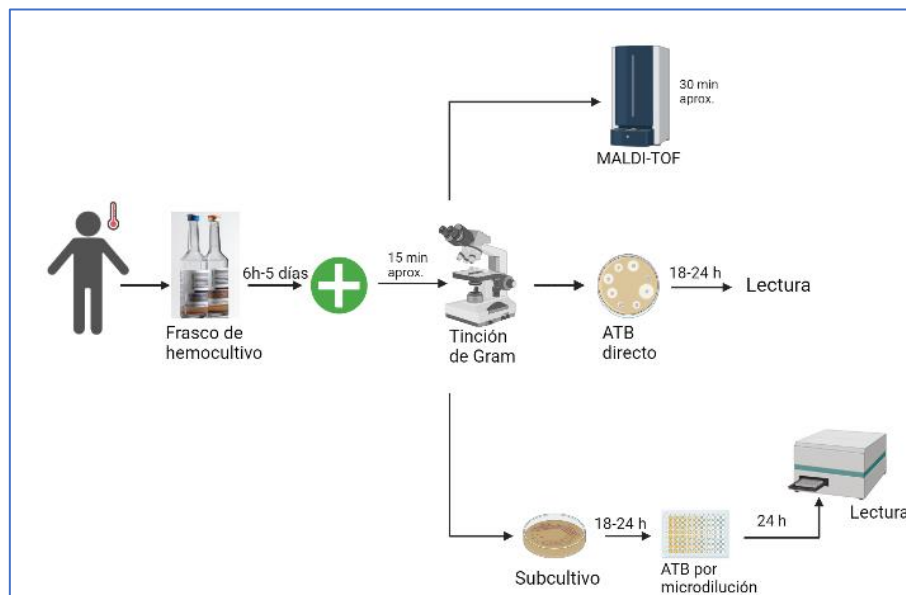


Imagen 4. Esquema del trabajo en rutina. Imagen creada con BioRender.

El sistema MicroScan® (Siemens) es un equipo comercial automatizado que realiza la identificación de microorganismos y las pruebas de sensibilidad antimicrobiana¹⁴. El equipo está compuesto por dos partes, por un lado, el WalkAway 96 plus que consiste en una estufa donde permanecen los paneles (Imagen 5) hasta realizar las correspondientes lecturas; y, por otro lado, el autoSCAN que permite realizar las lecturas de los paneles en momentos no programados en el WalkAway 96 plus.



Imagen 5. Paneles de inoculación de MicroScan®. Imagen obtenida de MicroScan Microbiology Portfolio¹⁴.

Métodos a estudio

- Antibiograma por difusión en disco directo de hemocultivo

Se inocularon placas de agar Mueller-Hinton o Mueller-Hinton Sangre con 150 µl de sangre extraída de frascos de hemocultivos positivos. El medio de cultivo y los discos empleados para cada microorganismo aparecen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Medios de cultivo, temperatura y atmósfera de incubación y antibióticos utilizados para las bacterias aisladas.

	Bacteria aislada			
	<i>E. coli, K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>
Medio de cultivo	Agar Mueller-Hinton	Agar Mueller-Hinton	Agar Mueller-Hinton	Agar Mueller-Hinton Sangre
Temperatura y atmósfera de incubación	36°C (+/-1°C)	36°C (+/-1°C)	36°C (+/-1°C)	36°C (+/-1°C) con atmósfera enriquecida con CO2 al 5%
Antibióticos	Piperacilina-tazobactam 30-0,06 µg Cefotaxima 5 µg Ceftazidima 10 µg Imipenem 10 µg Meropenem 10 µg Ciprofloxacino 5 µg Levofloxacino 5 µg Amikacina 30 µg Gentamicina 10 µg Tobramicina 10 µg Cotrimoxazol (1,25-23,75 µg)	Piperacilina-tazobactam 30-0,06 µg Ceftazidima 10 µg Meropenem 10 µg Ciprofloxacino 5 µg Amikacina 30 µg Gentamicina 10 µg Tobramicina 10 µg Cotrimoxazol (1,25-23,75 µg)	Cefotaxima 30 µg Eritromicina 15 µg Clindamicina 2 µg	Eritromicina 15 µg Clindamicina 2 µg

Tras la incubación, las lecturas del diámetro del halo se realizaron a las 4, 6 y 8 horas, respectivamente (**Imagen 6**). La interpretación de las lecturas se realizó siguiendo las normas de EUCAST 2021 para pruebas rápidas de sensibilidad a los antimicrobianos

(www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/EUCAST_RAST_Breakpoint_Table_v_3.0.pdf).

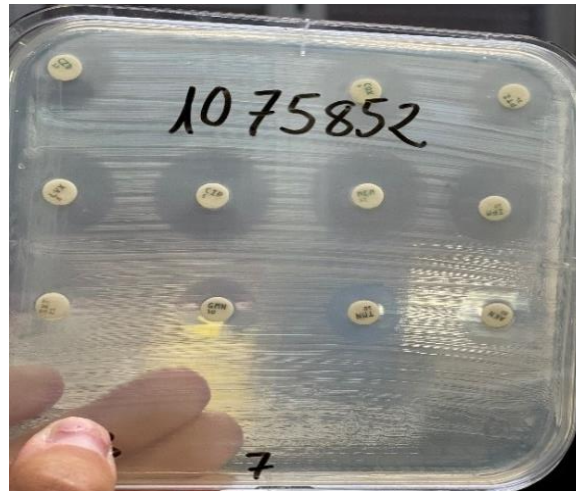


Imagen 6. Antibiograma mediante difusión en disco de un bacilo gramnegativo. Se observan halos de inhibición alrededor del disco de antibiótico.

- **Antibiograma por microdilución en caldo (MicroScan® WalkAway 96 plus y MicroScan® autoSCAN) directo de hemocultivo**

Se cogieron 10 ml del frasco de hemocultivo positivo y se colocaron en un tubo cónico estéril. Se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm. El sobrenadante se pasó a dos tubos Eppendorf™, que posteriormente fueron centrifugados durante 1 minuto a 13000 rpm.

Posteriormente, el sobrenadante se desechó y el pellet fue resuspendido en suero fisiológico. Se repitió este proceso dos veces. A continuación, se desechó el sobrenadante de uno de los dos tubos y se juntaron los dos pellets en un único tubo. Finalmente, se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto, se decantó el sobrenadante y con la ayuda del sistema de inoculación PROMPT™ (**Imagen 7**) se cogió el pellet y se introdujo en el rehidratante Stabilized Aqueous PLURONIC® surfactants (Beckman Coulter). Una vez inoculados los pocillos de la placa (**Imagen 5**) se introdujeron en la máquina MicroScan® (Siemens) y se hicieron lecturas a las 4, 6 y 8 horas mediante el autoSCAN y 24 horas mediante el MicroScan® WalkAway 96 plus.



Imagen 7. Sistema de inoculación PROMPT™. Imagen obtenida de MicroScan Microbiology Portfolio¹⁴.

Análisis de datos

La evaluación de los resultados obtenidos por las técnicas a estudio se realizó mediante comparación con los resultados obtenidos por las técnicas de rutina. El porcentaje de resultados legibles fue calculado para cada tiempo de incubación. Los resultados podían ser: no leído (por falta de crecimiento), leído y no categorizado (EUCAST marca unas medidas en las que se considera que existe incertidumbre técnica y no permite categorizar el resultado (ATU, *area of technical uncertainty*)) y leídos y categorizados como sensibles, intermedios (o sensible a dosis altas) o resistentes. En base a esto, los resultados discordantes se clasificaron en errores muy graves (*very major error* (VME), cuando el resultado fue sensible o intermedio (sensible a dosis altas) en las técnicas a evaluar, pero resistente en las de rutina); errores mayores (*major error* (ME), cuando el resultado en las técnicas a evaluar fue resistente, pero el de rutina fue sensible); y errores menores (*minor error* (mE), cuando el resultado en las técnicas a evaluar fue sensible, pero el de rutina intermedio o sensible a dosis altas).

RESULTADOS

Antibiograma por difusión en disco

En el estudio fueron incluidos 39 frascos de hemocultivos que incluían 33 hemocultivos con bacilos gramnegativos (28 de *E. coli*, 1 de *P. aeruginosa* y 4 de *K. pneumoniae*), 5 *S. aureus*, y un *S. pneumoniae*. Los resultados fueron analizados por separado en función del microorganismo aislado en los hemocultivos.

E. coli

Se leyeron el 100% de los antibióticos en todas las horas. En la **Tabla 2** se muestran el porcentaje de no categorizados (ATU), VME, ME y mE obtenido para cada antibiótico en cada uno de los momentos de lectura. La mayoría de ATU correspondieron a piperacilina-tazobactam y su número disminuyó a medida que avanzaban las horas para todos los antibióticos, excepto para amikacina.

K. pneumoniae

Tras las 4 primeras horas de incubación, la lectura pudo realizarse adecuadamente en el 100% de los antibióticos. Una de las cepas presentó un resultado no categorizable de piperacilina-tazobactam en las tres lecturas, siendo resistente en rutina. El resto de los antibióticos mostraron resultados iguales a los de rutina (todos sensibles) en todas las lecturas.

P. aeruginosa

Los datos obtenidos a las 4 horas no pudieron ser analizados debido a que EUCAST no presenta puntos de corte para *P. aeruginosa* para esa hora. Los datos obtenidos a las 6 y 8 horas concordaban con los de rutina. La cepa aislada era resistente a piperacilina-tazobactam, ceftazidima, imipenem, meropenem y cefepime; intermedio o sensible a dosis altas para ciprofloxacino y levofloxacino; y sensible para amikacina y tobramicina.

S. aureus

Los resultados de cefoxitina concordaron con los obtenidos por los métodos de rutina en las tres lecturas. Para la clindamicina, las 5 cepas fueron categorizadas como resistentes a las 4 horas de lectura; mientras que 4 de las 5 cepas fueron categorizadas como sensibles a las 6 y 8 horas, obteniéndose el mismo resultado que en rutina. Sin embargo, en las lecturas de las 6 y 8 horas, los resultados para clindamicina no pudieron ser clasificados en 1 cepa de *S. aureus*.

S. pneumoniae

A las 4 horas de lectura no se pudo realizar la lectura por falta de crecimiento. Las lecturas a las 6 y 8 horas mostraron que la cepa aislada era sensible a eritromicina y clindamicina, resultado concordante con los resultados de rutina. En la lectura del ETEST® de penicilina realizada a las 6 y 8 horas, la CMI fue de 0,016, igual que en rutina.

Antibiograma por microdilución

Se incluyeron en el estudio 30 hemocultivos positivos para *E. coli*, 5 para *S. aureus* y 3 para *K. pneumoniae*. Se ha analizado cada microorganismo por separado, pero solamente se han calculado los porcentajes de errores en los aislados de *E. coli*, que es aquel microorganismo que presentó un número más elevado de aislados.

E. coli

De los 30 aislados de *E. coli*, solamente en 20 de ellos obtuvimos lecturas completas a las 4, 6, 8 y 24 horas. Debido a fallos de registro de las lecturas, no hay información de 5 paneles a las 4 horas, 1 a las 6 horas, 2 a las 8 horas y 4 a las 24 horas. La mayoría de los resultados obtenidos por el método directo de hemocultivo concordaban con los de rutina, excepto para cotrimoxazol a las 4 horas de lectura, el cual presenta un alto número de VME (36%). A las 6 y 8 horas de lectura, la concordancia con los resultados de rutina fue muy alta, excepto para amoxicilina-ácido clavulánico y ciprofloxacino a las 6 horas (10, 34% de VME para ambos antibióticos). En cambio, a las 24 horas de lectura, tras comparar los resultados obtenidos con los de rutina, destacan 7,69% de VME para ciprofloxacino y tobramicina. Los resultados obtenidos pueden observarse en la **Tabla 3**.

K. pneumoniae

Las tres cepas resultaron ser sensibles a amikacina, amoxicilina-ácido clavulánico, ciprofloxacino, levofloxacino, meropenem, ertapenem, gentamicina, piperacilina-tazobactam, cotrimoxazol, aztreonam y tobramicina mediante los métodos de rutina. Sin embargo, fueron resistentes a ampicilina. En las 4 lecturas realizadas para el método rápido a estudio, los resultados coincidieron con los de rutina en los antibióticos anteriormente nombrados. Se observó un VME para colistina en una de las cepas (sensible en las 4 lecturas del método rápido a estudio, pero resistente en rutina). Para una de las cepas los resultados a las 4, 6 y 8 horas fueron intermedio o sensible a dosis altas, pero sensible a las 24 horas y en rutina.

S. aureus

Los resultados para clindamicina y eritromicina con el método rápido a estudio coincidieron en todas las lecturas con el obtenido en rutina, siendo categorizados como sensibles para ambos antibióticos.

Tabla 2. ATU, VME, ME y mE a las 4, 6 y 8 horas de lectura de hemocultivos donde se aisló *E. coli* para cada antibiótico testado. Resultados obtenidos basándonos en EUCAST RAST Breakpoint Tables version 3 (v. 3.0).

ATB	4 horas										6 horas										8 horas									
	TL	ATU	% ATU	TC	VME	%	ME	%	mE	%	TL	ATU	% ATU	TC	VME	%	ME	%	mE	%	TL	ATU	% ATU	TC	VME	%	ME	%	mE	%
Piperacilina-tazobactam	28	17	60,71	11	0	0	7	63,64	0	0	28	14	50	14	0	0	3	21,43	0	0	28	10	35,71	18	0	0	0	0	0	0
cefotaxima	28	2	7,14	26	0	0	1	3,85	0	0	28	0	0	28	0	0	0	0	0	0	28	0	0	28	0	0	0	0	0	0
ceftazidima	28	4	14,29	24	1	4,17	1	4,17	2	8,33	28	2	7,14	26	1	3,85	0	0	2	7,69	28	2	7,14	26	1	3,85	0	0	2	7,69
meropenem	28	1	3,57	27	0	0	0	0	3	11,11	28	0	0	28	0	0	0	0	3	10,714	28	0	0	28	0	0	0	0	3	10,71
ciprofloxacino	28	0	0	28	0	0	0	0	0	0	28	0	0	28	0	0	0	0	0	0	28	0	0	28	0	0	0	0	0	0
amikacina	27	4	14,81	23	0	0	1	4,35	0	0	27	0	0	27	0	0	0	0	0	0	27	1	3,70	26	0	0	0	0	0	0
gentamicina	28	3	10,71	25	0	0	1	4	0	0	28	1	3,57	27	0	0	0	0	0	0	28	0	0	28	0	0	0	0	0	0
tobramicina	28	3	10,71	25	0	0	1	4	0	0	28	2	7,14	26	0	0	0	0	0	0	28	1	3,57	0	0	0	0	0	0	0
cotrimoxazol	28	0	0	28	0	0	1	3,57	0	0	28	0	0	28	1	3,57	0	0	0	0	28	0	0	28	1	3,57	0	0	0	0

ATB: Antibiótico; **TL:** Total leídos; **TC:** Total categorizados; **ATU:** Area of technical uncertainty; **VME:** Very major error; **ME:** Mayor error; **mE:** Minor error.

Tabla 3. Resultados de CMI de *E. coli* obtenidos con el sistema lectura automatizado MicroScan® a las 4, 6, 8 y 24 horas.

ATB	4 horas						6 horas						8 horas						24 horas										
	TL	VME	%	ME	%	mE	%	TL	VME	%	ME	%	mE	%	TL	VME	%	ME	%	mE	%	TL	VME	%	ME	%	mE	%	
Amikacina	25	0	0	0	0	0	0	29	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	0
Ampicilina	25	3	12	1	4	0	0	29	1	3,44	1	3,44	0	0	28	0	0	1	3,57	0	0	26	0	0	1	3,84	0	0	
Amoxicilina- ácido clavulánico	25	3	12	0	0	0	0	29	3	10,34	0	0	0	0	28	2	7,14	1	3,57	0	0	26	1	3,84	1	3,84	0	0	
Aztreonam	25	4	16	0	0	0	0	29	2	6,89	0	0	1	3,44	28	1	3,57	0	0	1	3,57	26	1	3,84	0	0	1	3,84	
Ceftazidima	25	3	12	0	0	0	0	29	2	6,89	0	0	0	0	28	2	7,14	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	
Cefotaxima	25	1	4	0	0	0	0	29	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	1	3,84	0	0	
Colistina	25	0	0	0	0	0	0	29	1	3,44	0	0	0	0	28	1	3,57	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	
Ciprofloxacino	25	3	12	0	0	0	0	29	3	10,34	0	0	0	0	28	2	7,14	0	0	0	0	26	2	7,69	0	0	0	0	
Ertapenem	25	0	0	0	0	0	0	29	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	
Gentamicina	25	0	0	0	0	0	0	29	0	0	0	0	0	28	0	0	1	3,57	0	0	26	0	0	0	0	0	0	0	
Imipenem	25	0	0	0	0	0	0	29	1	3,44	0	0	0	0	28	1	3,57	0	0	0	0	26	1	3,84	0	0	0	0	
Levofloxacino	25	3	12	0	0	0	0	29	2	6,89	0	0	0	0	28	1	3,57	0	0	0	0	26	1	3,84	0	0	0	0	
Meropenem	25	0	0	0	0	0	0	29	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	
Piperacilina-tazobactam	25	0	0	0	0	0	0	29	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	
Cotrimoxazol	25	9	36	0	0	0	0	29	3	10,34	0	0	0	0	28	1	3,57	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	
Tobramicina	25	3	12	0	0	0	0	29	2	6,89	0	0	0	0	28	2	7,14	0	0	0	0	26	2	7,69	0	0	0	0	

ATB: Antibiótico; **TL:** Total leídos; **VME:** *Very major error*; **ME:** *Major error*; **mE:** *Minor error*

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se evalúan técnicas rápidas de sensibilidad a antimicrobianos en hemocultivos positivos que nos permitan obtener el resultado de forma más rápida que con el protocolo establecido en rutina.

EUCAST ha presentado unas nuevas tablas con puntos de corte para realizar la lectura rápida de los antibiogramas por difusión en disco de hemocultivos positivos para tratar de adelantar la emisión de resultados. Este trabajo ha evaluado la posibilidad de lectura temprana y la concordancia de los resultados de estas técnicas con los de rutina. Además, se ha evaluado la realización del antibiograma por microdilución a partir de un pellet obtenido de los hemocultivos positivos y su lectura a las 4, 6, 8 y 24 horas, tratando de adelantar también este resultado.

Con los datos obtenidos en nuestro estudio, en el caso de *E.coli*, los métodos planteados muestran una mayor concordancia con los resultados de rutina a las 8 horas en el caso de los antibiogramas por difusión en disco y a las 24 horas en la microdilución. En el caso de los antibiogramas por difusión en disco, desde las 4 horas de lectura se podrían ofrecer resultados para antibióticos como ciprofloxacino y desde las 6 horas para amikacina, tobramicina, cefotaxima y gentamicina. Sin embargo, para piperacilina-tazobactam se debería esperar a los resultados de rutina, ya que se han observado muchos errores en las lecturas tempranas. En el caso de los antibiogramas por microdilución, se podrían proporcionar resultados desde las 4 horas en el caso de amikacina, ertapenem, meropenem y gentamicina. Para otros antibióticos como cefotaxima se podría valorar la emisión de un resultado temprano desde las 6 horas. Para el resto de antimicrobianos habría que esperar a la lectura a las 24h. Aun así, el método rápido propuesto reduciría la emisión de resultados 24h al realizarse desde el hemocultivo positivo y no desde subcultivo.

En base a los datos obtenidos en el estudio para *E. coli* los resultados de los antibiogramas rápidos por difusión en disco muestran una buena concordancia con los obtenidos en rutina (**Tabla 2**), excepto en el caso de piperacilina-tazobactam, ya que es el antibiótico que presenta mayor porcentaje de ME. Existen pocos estudios que hayan realizado antibiogramas por difusión en disco como método rápido para determinar la sensibilidad antimicrobiana. Uno de ellos es el realizado por EUCAST en 40 laboratorios del norte de Europa y en 15 del sur de Europa. En este estudio realizado por Akerlund et al. (2020)¹⁵ se demostró que la mayoría de los VME para *E. coli* correspondían a ciprofloxacino y el antibiótico que presentó mayor volumen de ATUs fue la piperacilina-tazobactam, el cual presentó la mayor cantidad de ME. Al igual que en nuestro estudio, piperacilina-tazobactam es el antibiótico que presenta mayor cantidad de ATUs (17 a las 4 horas, 14 a las 6 horas y 10 a las 8 horas) y de ME. Sin embargo,

en nuestro estudio, la mayoría de los VME son para ceftazidima y el ciprofloxacino no presenta errores.

En el caso de los antibiogramas por microdilución, hay pocos estudios realizados que hayan utilizado el sistema MicroScan® (Beckman Coulter) para la realización de pruebas rápidas de sensibilidad antimicrobiana. El estudio realizado por Sánchez et al. (2018)¹⁶ utilizó 97 hemocultivos de los que se aisló *E. coli* en 45 de ellos. La inoculación de los paneles de MicroScan® se realizó directamente mediante 50 µl de hemocultivo. El estudio concluye que el antibiótico que mayor porcentaje de VME presenta fue la piperacilina-tazobactam. Por el contrario, en nuestro estudio se observa una buena concordancia entre la técnica de microdilución rápida y la de rutina para piperacilina-tazobactam (**Tabla 3**).

En el estudio de Infante et al. (2020)¹⁷ que se llevó a cabo en el Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Universitario de San Juan (Alicante, España) se inoculó de forma directa paneles de MicroScan® utilizando 100 µl de hemocultivo positivo. Los resultados obtenidos fueron comparados con el método convencional (realizado a partir de un subcultivo) y se concluyó que la concordancia para *E. coli* era muy alta para todos los antibióticos (siendo el que mayor concordancia presentaba el imipenem). Sin embargo, piperacilina-tazobactam y amoxicilina-ácido clavulánico eran los antibióticos que menor concordancia presentaban con los resultados obtenidos en rutina, debido al elevado número de mE. En nuestro estudio, al contrario, el antibiótico que presenta mayor número de mE es el aztreonam.

Las diferencias observadas entre los estudios realizados por Sánchez e Infante y colaboradores, y nuestro trabajo pueden deberse a diferencias basadas en la metodología de trabajo; ya que, por ejemplo, Sánchez e Infante partieron de 50 y 100 µl de hemocultivo positivo respectivamente; nosotros, en cambio, de un pellet bacteriano obtenido del hemocultivo positivo. Otra diferencia puede deberse al volumen de muestras que se incorporaron en el estudio.

Una limitación de este estudio es la cantidad de hemocultivos positivos evaluados. Debido al estrecho margen de tiempo en el que se llevó a cabo el estudio y a la llegada al laboratorio de hemocultivos de forma aleatoria, la muestra estudiada es pequeña y no permite que con los resultados obtenidos se cambie el protocolo en el laboratorio. Para poder implementar estas técnicas rápidas habría que ampliar el estudio con un mayor número de hemocultivos.

Otra limitación para el uso de estas técnicas serían las bacteriemias mixtas. En el caso de detección de más de un microorganismo en la tinción de Gram, no se pueden llevar a cabo

las técnicas evaluadas en este estudio, ni tampoco aquellas de rutina que se basan en la inoculación directa. Estos casos requieren siempre de un subcultivo previo.

CONCLUSIONES

- En el caso de *E. coli* el antibiograma por difusión en disco parece ofrecer resultados comparables a los de rutina las 4 horas para ciprofloxacino y desde las 6 horas para amikacina, tobramicina, cefotaxima y gentamicina. El antibiograma por microdilución, en cambio, permite ofrecer resultados a las 4 horas para los antibióticos amikacina, ertapenem, meropenem y gentamicina; a las 6 horas para cefotaxima; y para el resto de los antibióticos, se debería esperar a la lectura de las 24 horas.
- Asimismo, en el caso de *E. coli*, la hora de emisión de resultados puede variar para el mismo antibiótico en función del tipo de antibiograma realizado, por ejemplo, por difusión en disco amikacina y gentamicina podrían informarse a las 6 horas; y por microdilución, a las 4 horas.
- En el caso de *E. coli*, piperacilina-tazobactam obtiene peores resultados por difusión en disco que por microdilución.
- Las técnicas rápidas de sensibilidad a antimicrobianos parecen permitir una emisión de resultados más rápida, antes de las 24 horas. Sin embargo, el número de hemocultivos positivos incluidos en este estudio es bajo, por lo que es necesaria la realización de estudios que incluyan un mayor número de hemocultivos, especialmente en el caso de bacterias diferentes a *E. coli*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez Díaz J.C., Guna Serrano R., Larrosa Escartín N., Marín Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. 2017. 62. Rodríguez Díaz J.C. (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017. “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”.
2. Kumar A., Roberts D., Wood Kenneth E., Light B., Parrillo Joseph E., Sharma S., ...Cheang M. (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine*; 34: 1589-1596.
3. Quesada M.D., Giménez M., Molinos S., Fernández G., Sánchez M.D., Rivelo R., ... Ausina V. (2010). Performance of VITEK-2 Compact and overnight MicroScan panels for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive FAN BacT/ALERT blood culture bottles. *Clinical Microbiology Infection*; 16: 137-140.
4. Huemer M., Mairpady Shambat S., Brugger S. D., Zinkernagel A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistente-Implications for human health and treatment perspectives. (review). *EMBO reports*; 21: e51034. DOI:10.15252/embr.202051034
5. Olesen S.W., Lipsitch M., Grad H.Y. (2020). *The role of “spillover” in antibiotic resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 117 (46) 29063-29068. DOI: 10.1073/pnas.2013694117
6. [Educación sobre pruebas de laboratorio en sangre, orina y otros líquidos biológicos | Lab Tests Online-ES](#)
7. Delgado-Iribarren García-Campos A. (Ed.). (2006). *Microbiología Médica*. Madrid, España: Editorial Elsevier
8. Camou T., Zunino P., Hortal M. (2017). Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Revista Médica del Uruguay* 33(4): 277-284.
9. Opota. O, Croxatto A., Prod`hom G., Greub G. (2015) Blood culture-based diagnosis of bacteriemia: state of the art. *Clinical Microbiology and Infection*; 21: 313-322.
10. Muñoz-Gamito G., Calbo-Sebastián E., Riera García M., Xercavins-Valls M., Rodríguez-Carballeira M., Garau-Aleman J. (2012). *Bacteriemias en la población de mayores de 80 años. Revista Clínica Española*; 212(6): 273-280

11. Cavalieri Stephen J., Coyle Marie B. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. Recuperado de:
<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>.
12. Picazo Juan J. (2000). *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. Recuperado de: www.seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf
13. Idelevich E.A., Becker K. (2019). How to accelerate antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*; 25 (2019) 1347-1355.
14. MicroScan Microbiology Portfolio. www.siemens.com/diagnostics
15. Akerlund A., Jonasson E., Matuschek E., Serrander L., Sundqvist M., Kahlmeter G. (2020). EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: validation in 55 European laboratories. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 75: 3230-3238.
16. Sánchez Yebra W., Obelleiro Campos A., del Gigia Aguirre L., Cabezas Fernández T., Sánchez Gómez J., de Lamo Sevilla C., ... Rodríguez Maresca M. (2019). Preliminary readings of antimicrobial susceptibility panels: A simple, fast and inexpensive way to detect bacterial resistance and enhance antibiotic treatment of bloodstream infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 94, 398-402.
17. Infante A., Ortiz de la Tabla V., Martín C., Gázquez G., Buñuel F. (2020). Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative rod on positive blood cultures using MicroScan panels. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*; 40 (1): 151-157. DOI: 10.1007/s10096-020-04014-3.

Por el presente documento se autoriza a D^a Maider del Cid Gómez, estudiante del Grado de Farmacia de la Universidad del País Vasco (UPV-EHU), a realizar el Trabajo de Fin de Grado (TFG) en el Hospital Universitario de Galdakao-Usansolo. El trabajo se llevará a cabo en el Servicio de Microbiología, bajo la tutela de Ana Gual de Torrella Bennasar e Izaskun Alejo Cancho, siendo el director del mismo el profesor de la UPV-EHU Ivan Manuel Vicente.

El trabajo se realizará con excedentes de muestras clínicas empleadas en la rutina diagnóstica del laboratorio, cuyo diagnóstico ya ha sido alcanzado y son, por lo tanto, muestras a desechar.

La estudiante no tendrá acceso a los datos clínicos y demográficos asociados a las mismas.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized loop followed by several vertical strokes and a horizontal line extending to the right.

M. Jose López de Goikoetxea

Jefa de Sección de Microbiología

Hospital Universitario Galdakao-Usansolo